

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FRAGE,
OB DIE FREISETZUNG VON VASOPRESSIN
AUS DER ISOLIERTEN NEUROHYPOPHYSE DER RATTE
ÜBER MUSKARINREZEPTOREN BEEINFLUSST WIRD

INGRID LOHNES

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552619_0051

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Untersuchungen über die Frage, ob die Freisetzung von Vasopressin
aus der isolierten Neurohypophyse der Ratte über Muskarinrezeptoren
beeinflußt wird

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz, den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Ingrid Lohnes geb. Langpaap
aus Oppenheim am Rhein

Mainz 1973

Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein
Referent: Professor Dr. E. Muscholl
Korreferent: Professor Dr. R. Krebs

Tag der mündlichen Prüfung: 12.6.1974

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLEN 1 · RUF 0 6132 / 57 11



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methoden	5
1. Gewinnung der Neurohypophyse	5
2. Inkubationsverfahren	5
3. Inkubationsmedien	6
4. Bestimmung des Vasopressingehaltes der Proben am Blutdruck der despinalisierten Ratte	7
5. Biologische Bestimmung von Vasopressin	9
6. Spezifität und Genauigkeit der Bestimmungsmethode	9
7. Verwendete Substanzen	10
8. Statistische Auswertungsmethode	11
C. Versuchsergebnisse	12
1. Freisetzung von Vasopressin in Locke-Lösung (Versuchsgruppe 1)	12
2. Freisetzung von Vasopressin in Locke-Lösung mit erhöhtem Kaliumgehalt (Versuchsgruppe 2)	12
3. Freisetzung von Vasopressin in Ca^{2+} -freier Locke- und K^+ -Locke-Lösung (Versuchsgruppe 3)	13
4. Freisetzung von Vasopressin in Locke- und K^+ - Locke-Lösung bei Zusatz von 1×10^{-4} M Oxotremorin (Versuchsgruppe 4)	14
5. Freisetzung von Vasopressin in Locke- und K^+ - Locke-Lösung bei Zusatz von 3×10^{-4} M Oxotremorin (Versuchsgruppe 5)	15
D. Diskussion	19
E. Zusammenfassung	26
F. Literaturverzeichnis	27

A. Einleitung

Es ist lange bekannt, daß die Neurohypophyse als Speicher- und Freisetzungsorgan für die beiden Oktapeptide Vasopressin und Oxytocin dient (Übersichten: Ginsburg 1968, La Bella 1968). Histologisch gesehen besteht die Neurohypophyse aus einer Ansammlung sekretorischer Nervenendigungen, deren dazugehörige Zellen sich im Nucleus supraopticus und paraventricularis im Hypothalamus befinden. Die beiden Hormone werden in den Zellkörpern der Nuclei synthetisiert. Sie wandern dann innerhalb sogenannter neurosekretorischer Granula das Axon entlang zu dem Gebiet der Nervenendigungen. Dort werden sie auf einen entsprechenden physiologischen Reiz hin direkt in die Blutgefäße der Neurohypophyse abgegeben.

Durch elektrophysiologische Untersuchungen (Brooks, Koizumi und Zeballos 1966, Dyball und Koizumi 1969 und Dyball 1971) wurde gezeigt, daß die Hormonfreisetzung aus der Neurohypophyse als Antwort auf nervöse Impulse erscheint. Die Impulse wirken auf die neurosekretorischen Zellen im Hypothalamus ein; in diesen entstehen Aktionspotentiale, welche den hypothalamo-neurohypophysären Trakt entlang laufen. An den Nervenendigungen bewirken die Potentiale dann eine Freisetzung der Hormone aus den neurosekretorischen Granula durch Exozytose (Nagasawa, Douglas u. Schulz 1970, Matthews, Legros, Grau, Nordmann u. Dreifuss 1973). Die Hypothese der Hormonfreisetzung auf der Basis depolarisierender elektrischer Impulse wurde durch die Arbeit von Douglas u. Poisner (1964 a) unterstützt. Die Autoren führten eine Depolarisation durch hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration in vitro herbei. Dies bewirkt wiederum einen Ca-Einstrom in die Axone, der letzten Endes für die Hormonfreisetzung verantwortlich ist.

Durch Arbeiten von Koelle (1961) und von Lederis u. Livingston (1966) wurde bekannt, daß das gesamte Acetylcholinssystem in der Neurohypophyse existiert. Aber bisher blieben alle in vitro

Versuche erfolglos, die Rezeptoren für exzitatorische Wirkungen von Acetylcholin an den neurosekretorischen Nervenendigungen nachweisen wollten (Douglas u. Poisner 1964 a, Dicker 1966). Dagegen gelingt es, an peripheren sympathischen Nervenendigungen mit Acetylcholin eine Freisetzung von Noradrenalin hervorzurufen (Richardson u. Woods 1959, Löffelholz 1967). Takeshige u. Volle (1964) konnten durch Potentialmessungen am Ganglion cervicale superius der Katze die Existenz dreier verschiedener cholinergischer Rezeptoren nachweisen. Neben den bekannten Rezeptoren für nikotinartige Wirkungen, die für die ganglionäre Impulsübertragung verantwortlich sind, fanden sie Rezeptoren für erregende muskarinartige und für hemmende muskarinartige Wirkungen. Nicht nur an Ganglienzellkörpern, sondern auch an postganglionären adrenergen Neuronen findet man Rezeptoren für exzitatorische nikotinartige Wirkungen. Werden sie durch Acetylcholin oder nikotinartige Substanzen erregt, so kommt es zu einer Transmitterfreisetzung (Übersicht: Burn u. Rand 1962). Durch Arbeiten von Löffelholz, Lindmar u. Muscholl 1967, Lindmar, Löffelholz u. Muscholl 1968, Löffelholz u. Muscholl 1969 a und b wurden zusätzlich noch Rezeptoren für hemmende muskarinartige Wirkungen bekannt. Bei Untersuchungen über die Noradrenalinfreisetzung aus perfundierten, isolierten Kaninchenherzen durch Acetylcholin fanden die Autoren, daß die durch Acetylcholin hervorgerufene Noradrenalinabgabe durch kleine Dosen Atropin erheblich gesteigert wird. Dagegen kommt es während der Perfusion mit Dimethylphenylpiperazinium (DMPP), einer nikotinartig wirkenden Substanz, auch ohne Atropin zu einer maximalen Noradrenalinabgabe. Die durch DMPP bedingte Noradrenalinabgabe kann durch muskarinartige Substanzen wie Pilocarpin oder Methacholin fast vollständig gehemmt werden. Der Zusatz kleiner Atropindosen macht diese Hemmung wieder rückgängig. Wird die Noradrenalinfreisetzung durch eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration erreicht, dann kann diese ebenfalls durch Methacholin über einen Angriff an den inhibitorischen Muskarinrezeptoren gehemmt werden (Dubey u. Muscholl 1973).

Nicht nur am perfundierten Kaninchenherzen, sondern auch am perfundierten Katzenherzen wurde eine muskarinartige Hemmung der Noradrenalinfreisetzung gefunden (Haeusler, Thoenen, Haefely u. Hürlimann 1968). Auch an den sympathischen Nerven der Zentralarterie des Kaninchenohres (Steinsland, Furchgott u. Kirpekar 1973) sowie der Vena saphena des Hundes (Vanhoutte, Lorenz u. Tyce 1973) wurde der gleiche muskarinartige inhibitorische Mechanismus beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb geprüft werden, ob nicht auch die neurosekretorischen Nerven der Hypophyse einem muskarinartigen inhibitorischen Mechanismus unterliegen wie die peripheren adrenergen Nerven.

Bei fast allen Versuchen, die sich um den Nachweis cholinerg Rezeptoren in der Neurohypophyse bemüht haben, wurde Acetylcholin verwandt, das sich pharmakologisch durch eine nikotinartige und eine muskarinartige Wirkung auszeichnet. Bei der Inkubation von isolierten Rattenhypophysen mit Acetylcholin, erwarteten Douglas u. Poisner (1964 a), daß es durch Erregung eventuell vorhandener Nikotinrezeptoren zu einer gesteigerten Vasopressinfreisetzung käme. Dies war jedoch nicht der Fall.

Nach den oben erwähnten neueren Befunden über die cholinergen Rezeptoren an der adrenergen Nervenfaser besteht aber die Möglichkeit, daß an den neurosekretorischen Nervenendigungen Rezeptoren für inhibitorische muskarinartige Wirkungen vorhanden sind, welche eine nikotinartige exzitatorische Wirkung von Acetylcholin antagonisieren.

Dieser Hypothese widerspricht jedoch, daß Acetylcholin auch nach Zusatz von Atropin nicht zu einer Vasopressinfreisetzung aus Rattenhypophysen führt (Kilbinger u. Muscholl, persönliche Mitteilung). Eine Erklärung dafür wäre, daß Acetylcholin möglicherweise aufgrund schlechter Diffusion oder wegen zu raschem Abbau durch die in der Neurohypophyse vorhandene Cholinesterase nicht bis an die Neurone herankommt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis eventuell vorhandener inhibitorischer Muskarinrezeptoren an den neurosekretorischen

Neuronen Oxotremorin verwandt, eine gut lipoidlösliche muskarinartige Substanz, welche von der Cholinesterase nicht abgebaut wird (Cho, Haslett u. Jenden 1962).

B. Methode

Alle Versuche wurden an weiblichen Albinoratten durchgeführt. Zur Gewinnung der Neurohypophysen wurden kleine Ratten von einem Gewicht zwischen 110 und 140 g verwandt, und die Tiere, die zur Rattenblutdruckmethode verwendet wurden, wogen zwischen 210 und 240 g.

1.) Gewinnung der Neurohypophysen

Die Präparation der Neurohypophysen wurde nach der Methode von Douglas u. Poisner (1964 a) durchgeführt. Die Ratten wurden dekapitiert, das Kopffell mit der Schere entfernt und die Schädeldecke eröffnet. Mit einer geraden Pinzette wurde das Gehirn abgehoben, wobei der Hypophysenstiel abreißt, und aus der Schädelkalotte herausgewälzt. Die Hypophysenregion wurde mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und die Schädelbasis mit drei Stecknadeln auf ein Brettchen fixiert. Mit Hilfe eines Zeiss Stereomikroskops wurden bei 12facher Vergrößerung zuerst die Meningen mit einer feinen Schere und einer geraden, spitzen Pinzette entfernt und anschließend mit zwei Präpariernadeln die Neurohypophyse von der Adenohypophyse gelöst. Unter Sicht des Auges wurde die stecknadelkopfgroße Neurohypophyse mit der Rasierklinge sagittal in zwei Hälften geteilt. Mittels einer kleinen Drahtöse wurden die beiden Hälften in eine Petrischale mit Lockelösung gelegt. Der Vorgang wurde wiederholt, da pro Versuchsansatz vier Hypophysenhälften benötigt wurden.

2. Inkubationsverfahren

Die vier Hälften wurden in einem Glasröhrchen in 1 ml Lockelösung bei 37°C 10 Min. lang inkubiert und dabei vorsichtig mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast. Das Inkubat wurde nach 10 Min. abgesaugt und die Hypophysen sofort wieder mit 1 ml Inkubationslösung bedeckt, die in einem Vorratsgefäß bei

37°C im Wasserbad gehalten wurde. Insgesamt wurden pro Versuch fünf Proben in 10minütigem Abstand gewonnen und bis zur Bestimmung im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Inkubation wurde unter fünf verschiedenen Bedingungen durchgeführt:

In der ersten Versuchsgruppe wurden die Hypophysenhälften nur in Locke-Lösung inkubiert, Gesamtkubationsdauer 50 Min. In der zweiten Versuchsgruppe wurde 40 Min. mit Locke-Lösung und anschließend 30 Min. mit K^+ -Locke-Lösung inkubiert. Die beiden ersten Inkubate von 10 und 20 Min. wurden verworfen, die folgenden Inkubate wieder als Proben 1 bis 5 gesammelt, wobei Probe 1 und 2 in Locke-Lösung und Probe 3,4 und 5 in K^+ -Locke-Lösung inkubiert worden waren.

In der dritten Versuchsgruppe wurde sowohl in der Locke-Lösung, als auch in der K^+ -Locke-Lösung $CaCl_2$ herausgelassen. Der Inkubationsablauf war der gleiche wie bei der Versuchsgruppe 2.

In der vierten Versuchsgruppe wurde der Locke-Lösung nach 30 Min. und 10 Min. danach der K^+ -Locke-Lösung Oxotremorin (1×10^{-4} M/ml) zugesetzt.

In der fünften Versuchsgruppe war der Versuchsablauf wie in der vorigen Gruppe, jedoch wurde die Oxotremorinkonzentration in der Locke- bzw. K^+ -Locke-Lösung auf 3×10^{-4} M/ml erhöht.

3. Inkubationsmedien

Die Hypophysenhälften wurden in einer Locke-Lösung inkubiert, die nach Douglas u. Poisner (1964 a) folgende Zusammensetzung hatte (mM/l): NaCl 154,0, KCl 5,6, $CaCl_2$ 2,2, $MgCl_2$ 1,1, $NaHCO_3$ 6,0, Glucose 10,0. Bei der als " K^+ -Locke-Lösung" bezeichneten Inkubationslösung wurden die Bestandteile wie folgt abgeändert (mM/l): NaCl 100,0, KCl 60,0, $CaCl_2$ 2,2, $MgCl_2$ 1,1, $NaHCO_3$ 6,0, Glucose 10,0. Douglas u. Poisner (1964 a) verwendeten bei ihrer Locke-Lösung mit erhöhtem Kaliumgehalt verschiedene Kaliumkonzentrationen und konnten zeigen, daß bei einer Kaliumkonzentration von 60 mM/l eine maximale Vasopressinfreisetzung erzielt wurde.

4. Bestimmung des Vasopressingehalts der Proben am Blutdruck der despinalisierten Ratte

Für diesen Versuchsteil wurden weibliche Albinoratten mit einem Gewicht von 210 - 240 g verwendet und nach der Methode von Shipley u. Tilden (1947), abgeändert nach Muscholl u. Vogt (1957) präpariert. Die Versuchstiere wurden mit Diäthyläther tief narkotisiert, an den vier Extremitäten auf einer Präparierplatte gefesselt und in die Trachea eine Polyäthylenkanüle eingebunden. Mit Hilfe eines stricknadeldicken Drahtes wurde durch das rechte Auge und durch das Foramen magnum hindurch der Rückenmarkskanal ausgebohrt. Die Ratte wurde sofort künstlich mit Luft beatmet. Die rechte A.carotis wurde freipräpariert und zur Kanülierung vorbereitet. Anschließend wurde die linke V.femoralis freigelegt und eine fein ausgezogene Polyäthylenkanüle eingebunden, die mittels eines Gummischlauches an ein Vorratsgefäß mit physiologischer Kochsalzlösung angeschlossen war. Jeder Ratte wurden 375 IE Heparin, gelöst in 0,3 ml physiologischer NaCl-Lösung, über den Gummischlauch i.v. injiziert. Die in die A.carotis eingebundene Kanüle stand mit einem Quecksilbermanometer in Verbindung, die Blutdruckreaktion wurde auf ein Rußkymographion (B.Braun, Apparatebau) aufgezeichnet. Der Blutdruck der despinalisierten Ratte lag bei 50-60 mm. Quecksilbersäule. Die zu bestimmenden Proben wurden i.v. injiziert und das injizierte Volumen auf 0,35 ml durch Nachspülen mit entsprechender Menge physiologischer NaCl-Lösung aus dem Vorratsgefäß ergänzt, um durch ein schnelles Verteilen der Probe im gesamten Körper der Ratte zu einem raschen und gleichmäßigen Blutdruckanstieg zu kommen. Die Proben wurden mit einer Vasopressinstandardlösung verglichen, die täglich neu hergestellt wurde. Sie enthielt 10 mE Vasopressin pro ml (3. Verdünnung). Eine stärkere Lösung (2. Verdünnung) von 200 mE/ml wurde im Kühlschrank aufbewahrt und alle 2 Wochen erneuert. Die 1. Verdünnung des Vasopressinstandards von 2 E/ml war als Vorrat für die ganze Versuchsdauer eingefroren. Bevor eine oxotremorinhaltige Probe injiziert wurde, erhielt die Ratte

unbekannte Lösung x

a

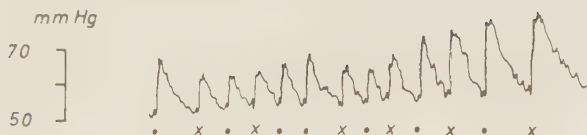
a

b

b

c

c



mE Vasopressin •

0,5

0,2

0,3

0,4

0,2

0,5

0,7

Abb. 1: Beispiel einer biologischen Bestimmung von Vasopressin

umgezeichnet nach der Registrierung vom Rußkymographion des Versuches vom 25.7.1973

unbekannte Lösung:

a = Probe 2; 0,15 ml, entsprechend 0,25 mE Vasopressin

b = Probe 3; 0,025 ml, entsprechend 0,35 mE Vasopressin

c = Probe 4; 0,05 ml, entsprechend 0,65 mE Vasopressin

1 mg Atropinsulfat, gelöst in 0,2 ml physiologischer NaCl-Lösung langsam i.v. injiziert, um den blutdrucksenkenden Effekt des Oxtremorins zu antagonisieren.

5. Biologische Bestimmung von Vasopressin

Der Vasopressingehalt der gewonnenen Proben wurde am gleichen Tag mit der Rattenblutdruckmethode bestimmt. Gelang die Bestimmung nicht am selben Tag, so wurden die Proben eingefroren und am darauffolgenden Tag bestimmt. Es wurde eine bekannte Menge Vasopressinstandard injiziert, die Blutdruckreaktion abgewartet und nach Erreichen der Grundlinie der Kurve ein konstant gehaltenes Volumen der zu untersuchenden Probe injiziert. War die Blutdruckreaktion der Probe größer als die der zuerst injizierten Menge Vasopressinstandard, so mußte die nächste Injektion eine größere Menge an Vasopressineinheiten besitzen. War die Blutdruckreaktion kleiner, dann wurde eine geringere Menge Vasopressin injiziert. Auf diese Weise gelang es, eine unbekannte Probe zwischen zwei bekannten Proben einzuklammern (s. Abb. 1). In der Regel genügten 2 - 3 Injektionen der zu untersuchenden Probe, um ihren Vasopressingehalt hinreichend genau zu bestimmen.

6. Spezifität und Genauigkeit der Bestimmungsmethode

Um zu zeigen, daß der pressorische Effekt der Eluate auf einen Gehalt an Vasopressin zurückzuführen ist, wurden einzelne Proben mit 0,02 M Natriumthioglykolat inkubiert. Nach Douglas u. Poisner (1964 a) sollte nach 30minütiger Inkubation mit 0,02 M Natriumthioglykolat ein pressorischer Effekt der Eluate nicht mehr nachweisbar sein. Die Hypophysen wurden in 1 ml Lockelösung 10 Min. bei 37°C inkubiert und die gewonnene Probe in Probe a1 und Probe a2 von 0,3 und 0,7 ml aufgeteilt. Probe a1 wurde unverändert aufgehoben. Wegen der geringen Haltbarkeit des Na-thioglykolats in wässriger Stammlösung wurden 1,6 mg der

Substanz in Probe a2 gegeben und 40 Min. inkubiert. Dies entsprach einer Endkonzentration von 0,02 M Natriumthioglykolat. Von insgesamt acht durchgeführten Bestimmungen wurde für Probe a1 ein Mittelwert von $7,96 \pm 1,8$ mE/10 min. und Hypophyse gefunden, und der Mittelwert von Probe a2 lag bei $1,84 \pm 0,3$ mE/10 min. und Hypophyse, d.h. von der ursprünglichen pressorischen Aktivität der Probe a1 war nur noch 25% in Probe a2 nachweisbar. Diese weitgehende Inaktivierung durch Natrium-thioglykolat zeigt, daß mit der Methode Vasopressin erfaßt wird.

Um die Genauigkeit der Bestimmungsmethode zu prüfen, wurden von einer anderen Person hergestellte Vasopressinlösungen untersucht, deren Konzentrationen der Untersucherin nicht bekannt waren. Insgesamt wurden 3 Lösungen bestimmt mit folgenden Werten:

1. <u>Lösung</u> :	Gefundener Wert:	9	mE/ml	Gegebener Wert:	8	mE/ml
2. <u>Lösung</u> :	"	"	7	mE/ml	"	"
3. <u>Lösung</u> :	"	"	3,6	mE/ml	"	"

Diese Werte zeigen zwischen gefundenen und tatsächlichen Werten eine so geringe Abweichung, daß man sich auf eine hinreichende Genauigkeit bei der Vasopressinbestimmung mit der Blutdruckmethode verlassen kann.

7. Verwendete Substanzen

Pitressin^R-Ampullen 20 IE/ml (Parke, Davis & Co., USA)
Vetren^R (Heparin-Natrium USP XV II, Promonta Hamburg)
Atropinsulfat (Boehringer Sohn, Ingelheim)
Natriumthioglykolat (Merck AG, Darmstadt)
Oxotremorin (Ega-Chemie, Steinheim)

8. Statistische Auswertungsmethode

1. Zum Vergleich von Probe 3 aus Versuchsgruppe 2, 4 und 5 wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet (Campbell 1971).

2. Um die verschiedenen Kontrollgruppen (Probe 1, Locke 20 - 30 min, aus Versuchsgruppe 2, 3, 4 und 5 und Probe 3, Locke 20 - 30 min, aus Versuchsgruppe 1) auf Signifikanz der Unterschiede zu prüfen, wurde die einfache Varianzanalyse verwendet (Campbell 1971).

Bei beiden Verfahren wurde ein Unterschied als statistisch signifikant angesehen, wenn die betreffende Prüfgröße den für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 0,05$ bei den entsprechenden Freiheitsgraden angegebenen Tabellenwert erreichte oder überschritt.

Streuungsangaben in Verbindung mit einem Mittelwert stellen in der vorliegenden Arbeit die Standardabweichung des Mittelwertes dar ($s_{\bar{x}}$); n bedeutet die Anzahl der Versuche.

C. Versuchsergebnisse

1. Freisetzung von Vasopressin in Locke-Lösung (Versuchsgruppe 1)

Diese Versuche wurden durchgeführt, um in Erfahrung zu bringen, zu welchem Zeitpunkt eine konstante Vasopressin-freisetzung unter Ruhebedingungen, d.h. in Abwesenheit eines sekretionsfördernden Reizes, eintritt. Insgesamt wurden acht Versuche durchgeführt, wobei je zwei Neurohypophysen 60 min in Locke-Lösung inkubiert wurden. Während der ersten 10 min der Inkubation war eine große Menge Vasopressin nachweisbar (s. Tab. 1). Die starke Freisetzung zu Beginn der Inkubation dürfte auf die Traumatisierung der Neurohypophysen beim Zerteilen in zwei Hälften und den schnellen Verlust von Vasopressin aus den geschädigten Zellen zurückzuführen sein. Von 10 - 20 min war die Vasopressinfreisetzung schon deutlich vermindert, und von 20 - 60 min hatte sie einen konstanten Wert erreicht, der als Ruhefreisetzung angesehen wurde. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden bei den nachfolgenden Versuchsgruppen die Inkubate der ersten 20 min verworfen. Die Vasopressinbestimmung erfolgte nur in den Inkubaten, die ab der 20. Min. gesammelt wurden.

2. Freisetzung von Vasopressin in Locke-Lösung mit erhöhtem Kaliumgehalt (Versuchsgruppe 2)

Es wurden wiederum 8 Versuche durchgeführt, wobei erst 40 min in Locke-Lösung und dann 30 min in K^+ -Locke-Lösung inkubiert wurde. Die von der 20. bis 40. min der Inkubation in Locke-Lösung gewonnenen Lösungen wiesen wie erwartet einen der Ruhefreisetzung entsprechenden Vasopressingehalt auf (s. Tab. 2). Dagegen enthielten die Proben, die während der ersten 10 min der Inkubation in K^+ -Locke-Lösung gewonnen wurden, eine zehnfach größere Menge an Vasopressin (s. Abb. 2, Tab. 2). Die Vasopressinfreisetzung nahm in den folgenden zwei Inkubationsperio-

den kontinuierlich ab, lag aber 20 - 30 min nach Zusatz von 60 mM/l Kalium noch sechs mal höher als die Ruhefreisetzung.

Da der Mittelwert von Probe 1 der jetzigen Versuchsgruppe - er wurde als dem Ruhewert entsprechend angesehen - von dem aus Versuchsgruppe 1 erhaltenen Ruhemittelwert geringfügig abweicht, stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um einen zufallsbedingten Unterschied handelt oder ob für diesen Unterschied eine andere Ursache in Frage kommt. Deshalb wurde eine einfache Varianzanalyse durchgeführt (s. Tab. 3). Sie umschließt sämtliche Proben 1 (Locke nach 20 - 30 min) aus den Versuchsgruppen 2, 3, 4 und 5 und Probe 3 (Locke nach 20 - 30 min) aus der Versuchsgruppe 1 (jeweils $n = 8$). Geprüft wurde, ob die Varianz zwischen den einzelnen Versuchsgruppen größer war als die innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Der errechnete F-Wert von 1,69 erreicht den für $P = 0,05$ angegebenen Tabellenwert der F-Verteilung jedoch nicht. (s. Tab. 3) Das bedeutet, daß die Abweichungen zwischen den Mittelwerten, die für Probe 1 aus Versuchsgruppe 2, 3, 4 und 5 erhalten wurden, sich nicht signifikant unterscheiden und somit als Stichproben-Mittelwerte der gleichen Grundgesamtheit angesehen werden können.

3. Freisetzung von Vasopressin in Ca-freier Locke- und K^+ -Locke-Lösung (Versuchsgruppe 3)

Bei dieser Versuchsgruppe ($n = 8$) wurde die Inkubation wie bei der Versuchsgruppe 2 durchgeführt, allerdings war sowohl der Locke- als auch der K^+ -Locke-Lösung kein $CaCl_2$ zugesetzt worden. Der Vasopressingehalt der Proben 1 und 2 nach 30 bzw. 40 min Inkubation in Locke-Lösung ohne $CaCl_2$, unterschied sich nicht von der Vasopressinmenge, die für Probe 1 und 2 aus der Versuchsgruppe 2 bestimmt worden war (s. Tab. 2). Das Fehlen von Ca-Ionen hatte somit die Vasopressinruhefreisetzung nicht beeinträchtigt. Wie aus der 30minütigen Inkubation mit

K⁺-Locke-Lösung ohne CaCl₂ gewonnenen Proben 3, 4 und 5 unterschieden sich hinsichtlich ihres Vasopressingehaltes dagegen deutlich von den Proben 3, 4 und 5 der Versuchsgruppe 2 (s. Tab. 2). In den Proben 3, 4 und 5 der jetzigen Versuchsgruppe ließen sich nur geringe Mengen Vasopressin nachweisen, obwohl in einer Locke-Lösung mit erhöhtem Kaliumgehalt inkubiert worden war, die in Versuchsgruppe 2 eine bis zu zehnfache Steigerung der Vasopressinfreisetzung bewirkt hatte. Somit genügt eine hohe Kaliumkonzentration allein nicht, um zu einer Vasopressinfreisetzung zu führen; es bedarf der Anwesenheit von Ca-Ionen.

4. Freisetzung von Vasopressin in Locke- und K⁺-Locke-Lösung bei Zusatz von 1×10^{-4} M Oxotremorin (Versuchsgruppe 4)

Bei Durchführung dieser 8 Versuche wurde von der Voraussetzung ausgegangen, daß Oxotremorin möglicherweise in der Lage wäre, eine Vasopressinfreisetzung zu verhindern. Es wurde anschließend 40 min mit Locke- bzw. K⁺-Locke-Lösung mit Oxotremorinzusatz inkubiert. Probe 1 (Inkubation in Locke-Lösung, 20 - 30 min) enthielt eine der Ruhefreisetzung entsprechende Vasopressinmenge, Probe 2 (Locke-Lösung mit 1×10^{-4} M Oxotremorin, 30 - 40 min) ebenfalls. Eine Veränderung der Vasopressinruhefreisetzung durch Oxotremorin war also nicht festzustellen. Auch die Vasopressinkonzentrationen der Proben 3, 4 und 5 waren gegenüber derjenigen der Proben 3, 4 und 5 aus der Versuchsgruppe 2 nicht verändert, obwohl sich Oxotremorin in der K⁺-Locke-Lösung befand (s. Tab. 2). Bei Vergleich der beiden Proben 3 aus der Versuchsgruppe 2 und 4 mit dem t-Test wurde die Signifikanzgrenze $P=0,05$ nicht erreicht ($t = 1,59$ bei 14 Freiheitsgraden, $P \gg 0,1$). Die Anwesenheit von 1×10^{-4} M Oxotremorin in der Inkubationslösung hatte demnach die durch Kalium erhöhte Vasopressinfreisetzung nicht hemmen können.

5. Freisetzung von Vasopressin in Locke- und K^+ -Locke-Lösung bei Zusatz von 3×10^{-4} M Oxotremorin (Versuchsgruppe 5)

Da mit 1×10^{-4} M Oxotremorin keine Veränderung der Vasopressinfreisetzung erreicht werden konnte, wurden die Versuche mit einer höheren Konzentration an Oxotremorin wiederholt. Es wurden wiederum 8 Versuche durchgeführt mit dem gleichen Inkubationsschema wie bei Versuchsgruppe 4, die Oxotremorinkonzentration betrug 3×10^{-4} M/ml. Bei der Bestimmung des Vasopressingehaltes der Proben 1 - 5 wurden Werte ermittelt, die praktisch identisch waren mit den Werten der Versuchsgruppe 2 und 4 (s. Tab. 2). Die Signifikanzprüfung auf Unterschiede der beiden Proben 3 aus der Versuchsgruppe 2 und 5 ergab ein $P > 0,6$ ($t = 0,45$ bei 14 Freiheitsgraden). Somit zeigte sich auch bei erhöhter Oxotremorinkonzentration keine Hemmung der Vasopressinfreisetzung.

Tab. 1: Vasopressinfreisetzung während Inkubation von Rattenhypophysen in Locke-Lösung (Versuchsgruppe 1).

Zeit (min)	0-10	10-20	20-30	30-40	40-60
Inkubations- Lösung	Locke	Locke	Locke	Locke	Locke
Vasopressin					
(mE/10 min u. Hypophyse)	$12,33 \pm 1,85$	$4,83 \pm 1,09$	$2,15 \pm 0,54$	$2,38 \pm 0,64$	$2,33 \pm 0,59$

angegeben sind die Mittelwerte $\pm s_x$ der Freisetzungen (mE/10 min und Hypophyse) aus acht Versuchen.

Tab. 2: Vasopressinfreisetzung während Inkubation von Rattenhypophysen in verschiedenen Lösungen

Probe	1	2	3	4	5
Zeit (min)	20 - 30	30 - 40	40 - 50	50 - 60	60 - 70
Versuchsgruppe 2	Locke 1,11 $\pm$ 0,14	Locke 0,95 $\pm$ 0,18	K ⁺ -Locke 9,41 $\pm$ 0,98	K ⁺ -Locke 7,25 $\pm$ 0,61	K ⁺ -Locke 6,26 $\pm$ 0,79
Versuchsgruppe 3	Locke ohne CaCl ₂ 1,66 $\pm$ 0,32	Locke ohne CaCl ₂ 1,02 $\pm$ 0,18	Locke ohne CaCl ₂ 0,82 $\pm$ 0,16	Locke ohne CaCl ₂ 0,84 $\pm$ 0,18	Locke ohne CaCl ₂ 0,98 $\pm$ 0,25
Versuchsgruppe 4 1 x 10 ⁻⁴ M Oxotremorin	Locke 0,97 $\pm$ 0,2	Locke + Oxotremorin 0,84 $\pm$ 0,13	K ⁺ -Locke + Oxotremorin 7,12 $\pm$ 1,04	K ⁺ -Locke + Oxotremorin 7,37 $\pm$ 1,77	K ⁺ -Locke + Oxotremorin 6,75 $\pm$ 1,55
Versuchsgruppe 5 3 x 10 ⁻⁴ M Oxotremorin	Locke 1,80 $\pm$ 0,49	Locke + Oxotremorin 0,93 $\pm$ 0,13	K ⁺ -Locke + Oxotremorin 8,75 $\pm$ 1,09	K ⁺ -Locke + Oxotremorin 6,78 $\pm$ 0,69	K ⁺ -Locke + Oxotremorin 6,35 $\pm$ 0,73

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ s_x der Freisetzen (mE/10 min und Hypophyse). Jede Versuchsgruppe enthält acht Einzelversuche.

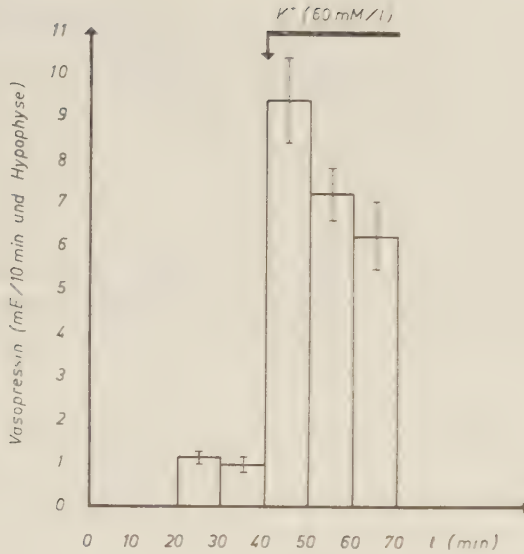


Abb. 2: Vasopressinfreisetzung während Inkubation von Rattenhypophysen in Locke-Lösung mit erhöhter Kaliumkonzentration (Versuchsgruppe 2).

Höhe der Säulen = Mittelwerte $\pm s_{\bar{x}}$ aus acht Versuchen
t = Inkubationszeit

Tab. 3: Einfache Varianzanalyse

für Probe 3 (Locke 20-30 min) aus Versuchsgruppe 1 und
für sämtliche Proben 1 aus Versuchsgruppe 2, 3, 4 und
5 (Locke 20-30 min) (jeweils $n = 8$).

Art der Variation	SAQ	FG	MAQ	F	P
Zwischen den Versuchsgruppen	77654	4	19413	1,69	$>0,05$ n.s.
Innerhalb der Versuchsgruppen	401981	35	11485		
Total	479635	39			

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

MAQ = Mittleres Abweichungsquadrat

FG = Anzahl der Freiheitsgrade

Für $P = 0,05$ bei $FG_1 = 4$ und $FG_2 = 35$; $F = 2,64$

D. Diskussion

Gerschenfeld, Tramezzani u. De Robertis (1960), Koelle (1961) und Koelle u. Geesey (1961) war es gelungen, in der Neurohypophyse Acetylcholinesterase nachzuweisen. Deshalb glaubten sie, Acetylcholin spiele bei der Vasopressinfreisetzung aus den neurosekretorischen Nervenendigungen in der Hypophyse eine Rolle. Seitdem diese Forderung nach einem cholinergen Überträgermechanismus in der Neurohypophyse bestand, haben sich viele Arbeitsgruppen bemüht, die physiologischen Vorgänge, die von Bargmann (1947) als Neurosekretion bezeichnet wurden, aufzuklären.

Douglas u. Rubin (1961) und Douglas u. Poisner (1962) zeigten, daß Nebennierenmarkshormone bei Anwesenheit eines Kaliumüberschusses oder durch Acetylcholin freigesetzt werden. Acetylcholin depolarisiert dabei die Membran und ermöglicht einen gesteigerten Ca-Influx in die chromaffine Zelle. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuteten sie einen ähnlichen Sekretionsmechanismus in einem anderen endokrinen Organ, nämlich in der Neurohypophyse. Diese Vermutung konnte aber nicht in allen Punkten bestätigt werden (Douglas 1963, Douglas u. Poisner 1963 a, 1963 b, 1964 b).

Die von Douglas u. Poisner (1964 a) durchgeführten Versuche enthielten pro Versuchsansatz jeweils fünf isolierte Rattenhypophysen, die sie *in vitro* in einer Locke-Lösung inkubierten. Die Inkubationslösung enthielt dabei $5,6 \text{ mM K}^+/1$ und $2,2 \text{ mM Ca}^{2+}/1$. Da bei den hier vorliegenden Versuchen eine empfindlichere Bestimmungsmethode von Vasopressin angewandt wurde, genügten pro Versuchsansatz jeweils nur zwei Hypophysen; die Zusammensetzung der Locke-Lösung dagegen war die gleiche. Douglas und Poisner zeigten, daß in diesem Inkubationsmedium eine gleichmäßige, wenn auch niedrige Vasopressinfreisetzung stattfindet. Diese Aussage konnte durch die Ergebnisse aus Versuchsgruppe 1 bestätigt werden, da auch hier bei Abwesenheit eines sekretionsfördernden Reizes eine nur geringe Freisetzung im Inkubationsmedium zu messen war.

In weiteren Versuchen veränderten Douglas und Poisner die Kaliumkonzentration und fanden eine maximale Freisetzung im Bereich von 60 - 90 mM K^+ /l. Die Freisetzung überstieg die Ruhefreisetzung erst ab einer Kaliumkonzentration von 30 mM K^+ /l. Aufgrund dieser Aussage wurde bei den hier vorliegenden Versuchen eine Kaliumkonzentration von 60 mM/l gewählt, wenn in einer Locke-Lösung mit erhöhtem Kaliumgehalt inkubiert wurde. Diese erhöhte Kaliumkonzentration führte bei den hier durchgeführten Versuchen zu einer um den Faktor 10 gesteigerten Vasopressinfreisetzung in das Inkubationsmedium, wie die Ergebnisse aus Versuchsgruppe 2 zeigen. Die gleiche Beobachtung hatten auch Douglas und Poisner gemacht.

Da diese Kaliumabhängigkeit an die Kaliumabhängigkeit der Depolarisation von Muskelzellen erinnert, glaubten Douglas und Poisner, daß bei Kaliumüberschuß eine Depolarisation der Nervenendigungen in der Neurohypophyse stattfindet. Eine Freisetzung des Hormons gelingt aber nicht allein durch Depolarisation infolge einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration, sondern erst in Anwesenheit von Calcium. Denn ließen Douglas und Poisner Calcium aus dem Inkubationsmedium heraus, so erreichten sie trotz hoher Kaliumkonzentration keine Freisetzung. Diese Beobachtung wurde wiederum durch die Ergebnisse aus Versuchsgruppe 3 bestätigt. Um eine maximale Antwort auf einen Kaliumüberschuß zu erhalten, bedarf es einer Calciumkonzentration zwischen 2,2 und 4,4 mM/l, wie Douglas und Poisner herausfanden. Deshalb folgerten sie aus ihren Ergebnissen, daß durch Kaliumüberschuß eine Depolarisation erfolgt, die wiederum einen Calciumeinstrom in die neurosekretorischen Nervenendigungen bewirkt. Dadurch wird dann die Abgabe des in den Granula der Nervenendigungen gespeicherten Hormons induziert. Der Ca-Influx wird um das fünffache gesteigert, wenn eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration vorhanden ist, wie Untersuchungen von Douglas u. Poisner (1964 b) mit ^{45}Ca ergaben. Diese Calciumabhängigkeit der Vasopressinfreisetzung entspricht somit der Calciumabhängigkeit der Noradrenalinfreisetzung aus der chromaffinen Zelle. Die vermutete Parallelität hinsichtlich des Sekretionsmechanismus zwischen Neurohypophysenhormon und Nebennierenmarkshormon konnte in diesem Punkt bestätigt werden.

Wird der Hypophysenstiel elektrisch gereizt (Douglas u. Poisner 1964, Mikiten u. Douglas 1965), so ist ebenfalls zur Wirksamkeit des elektrischen Reizes eine bestimmte Kalium- und Calciumkonzentration notwendig. Die grundlegende Beobachtung, nämlich, daß die Vasopressinfreisetzung aus Rattenhypophysen in vitro abhängig ist von einer bestimmten Calciumkonzentration, wurde von Dicker (1966), Haller, Sachs, Sperelakis u. Share (1965) und Thorn (1966, 1967) bestätigt; eine erneute Bestätigung fand sie durch die hier vorliegenden Versuche.

Es besteht heute kein Zweifel mehr daran, daß nervöse Impulse, vom Nucleus supraopticus ausgehend, in Form eines Aktionspotentials die neurosekretorischen Axone entlanglaufen und die Freisetzung des in der Neurohypophyse gespeicherten Hormons bewirken (Übersichten: Sachs 1970 und Lederis u. Jayasena 1970). Trotzdem sind die Untersuchungen nicht zum Stillstand gekommen, wie eine Arbeit von Dreifuss, Grau u. Nordman (1972) zeigt, denen der Nachweis gelang, daß der sogenannte langsame Calciumeinstrom am Ende der Depolarisation für die Vasopressinfreisetzung verantwortlich ist. Insgesamt ist die Prüfung der Hormonfreisetzung aus dem Hypophysenhinterlappen zu einem beliebten Modell geworden, um den Einfluß verschiedener Ionen auf die Neurosekretion zu untersuchen (MacLeod u. Fontham 1970 und Kraicer u. Milligan 1973).

Ausgehend von Koelle u. Geesey (1961), die glaubten, daß bei der Vasopressinfreisetzung ein cholinerg Mechanismus eine Rolle spielen könnte, untersuchten Douglas u. Poisner (1964 a), Dicker (1966), Daniel u. Lederis (1966) und Thorn (1966) die Wirkung von Acetylcholin auf isolierte Rattenhypophysen in vitro. Keinem der Autoren gelang es, in vitro durch Acetylcholin eine Vasopressinfreisetzung hervorzurufen. Dieses Ergebnis war überraschend, denn Lederis u. Livingston (1966) fanden das gesamte Acetylcholinsystem in der Neurohypophyse des Kaninchens; außerdem hatten Gerschenfeld et al. (1960) an den Nervenendigungen in der Neurohypophyse elektronenmikroskopisch sogenannte optisch leere Granula entdeckt, die sie für synaptische Vesikel hielten und die möglicherweise Acetylcholin enthalten sollten. Weiterhin

kommt hinzu, daß Acetylcholin durch Depolarisation der Membran die Katecholaminfreisetzung aus der chromaffinen Zelle bewirkt, die wiederum calciumabhängig ist. Da eingangs gezeigt wurde, daß die Vasopressinfreisetzung calciumabhängig ist, hätte ebenso in diesem Punkt eine Parallelität hinsichtlich der Wirkung von Acetylcholin bestehen können. Da sich Acetylcholin durch zwei pharmakologisch wirksame Komponenten auszeichnet, nämlich eine muskarinartige und nikotinartige, wäre zu untersuchen gewesen, welche Komponente möglicherweise an den neurosekretorischen Nervenendigungen angreift.

Wie schon lange bekannt ist, wird Noradrenalin aus postganglionären sympathischen Nervenfasern durch einen Angriff von Acetylcholin an den Nikotinrezeptoren freigesetzt (Übersichten: Burn u. Rand 1962; Muscholl 1970). Weiterhin weiß man, daß eine Steigerung der Noradrenalinfreisetzung erreicht werden kann, indem bei Reizung durch Acetylcholin die hemmende muskarinartige Wirkung an der terminalen Nervenfaser durch Zugabe von Atropin ausgeschaltet wird (Übersichten: Muscholl, 1970 u. 1972; s. auch Einleitung).

Wegen dieses muskarinartigen inhibitorischen Mechanismus kann eine maximale Antwort auf eine Stimulation der Nikotinrezeptoren durch Acetylcholin erst dann erhalten werden, wenn die muskarinartige Wirkung von Acetylcholin durch Zusatz von Atropin vollständig blockiert wird. Denn die Muskarinrezeptoren an der peripheren adrenergen Nervenfaser werden durch sehr viel niedrigere Acetylcholinkonzentrationen erregt als die Nikotinrezeptoren. Auch die durch elektrische Stimulation der sympathischen Nervenfasern hervorgerufene Noradrenalinfreisetzung kann über einen Angriff an den Muskarinrezeptoren durch Acetylcholin gehemmt werden (Löffelholz u. Muscholl 1969 a, 1969 b).

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse könnten die oben geschilderten Versuche von Douglas und Poisner, bei denen Acetylcholin aus Rattenhypophysen keine Vasopressinfreisetzung bewirkte, unter folgendem Gesichtspunkt betrachtet werden: An den neurosekretorischen Nervenendigungen könnte ein muskarinartiger inhibitorischer Mechanismus so ausgeprägt sein, daß bei Inkubation mit Acetylcholin die möglicherweise vorhandene exzitatorische Nikotinwirkung nicht in Erscheinung tritt. In Analogie zu den für das Kaninchenherz beschriebenen Versuchen, sollte

danach im Inkubationsmedium neben Acetylcholin vorhandenes Atropin die Vasopressinfreisetzung ermöglichen. Unveröffentlichte Versuche von Muscholl und Kilbinger an isolierten Rattenhypophysen zeigten jedoch, daß Acetylcholin auch bei Zusatz von Atropin nicht zu einer Vasopressinfreisetzung führte. Wenn auch danach die Existenz von Nikotinrezeptoren an der Neurohypophyse ausgeschlossen erscheint, blieb noch zu prüfen, ob eventuell Muskarinrezeptoren vorhanden sind.

Zu diesem Zweck wurden die Rattenhypophysen in der hier vorliegenden Arbeit mit Oxotremorin inkubiert (vgl. Versuchsgruppe 4 und 5). Oxotremorin, ein Metabolit des Tremorins, ist ein Parasympathomimetikum mit muskarinartiger Wirkung; es ist sehr gut lipoidlöslich, penetriert demzufolge rasch in Nervengewebe und wird durch Cholinesterase nicht abgebaut (Cho, Haslett u. Jenden 1962). Aus diesem Grund erübrigt sich der Zusatz eines Cholinesterasehemmstoffes zum Inkubationsmedium, wie er z.B. von Douglas u. Poisner (1964 a) in ihren Versuchen mit Acetylcholin vorgenommen wurde. Diese Autoren hatten dem Medium Eserin oder Diisopropylfluorphosphat (DFP) zugesetzt, damit Acetylcholin von der in der Neurohypophyse vorhandenen Cholinesterase nicht abgebaut werden konnte. Am Kaninchenherzen ist Oxotremorin ein stärkerer muskarinischer Hemmstoff der Noradrenalinfreisetzung nach sympathischer Nervenreizung als Acetylcholin oder Methacholin (Fozard u. Muscholl 1972).

Wären an den Nervenendigungen der Neurohypophyse inhibitorische Muskarinrezeptoren vorhanden, in Parallelität zu den peripheren adrenergen Nerven, dann hätte während der Inkubation mit Oxotremorin eine Hemmung der durch Kaliumionen hervorgerufenen Vasopressinfreisetzung eintreten müssen. Da aber trotz Erhöhung der Oxotremorinkonzentration von 1×10^{-4} M auf 3×10^{-4} M und einer 30minütigen Inkubationsdauer die durch Kaliumüberschuß hervorgerufene Vasopressinfreisetzung nicht vermindert werden konnte, muß der Schluß gezogen werden, daß an den Nervenendigungen der Neurohypophyse inhibitorische Muskarinrezeptoren fehlen. Damit unterscheiden sich die neurosekretorischen Nervenendigungen offensichtlich von den peripheren sympathischen Nervenendigungen.

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß an den neurosekretorischen Nervenendigungen muskarinartige Rezeptoren fehlen; wird jedoch der gesamte supraoptische-neurohypophysäre Trakt inkubiert, dann gelingt es, mit Acetylcholin eine Vasopressinfreisetzung im Sinne einer nikotinartigen Exzitation hervorzurufen, wie die Arbeit von Eggena u. Thorn (1970) zeigt.

Jedoch ist die durch Acetylcholin induzierte Freisetzung geringer als die durch Kaliumüberschuß hervorgerufene Freisetzung. Mit diesen Ergebnissen ist zu vereinbaren, daß Acetylcholin an den neurosekretorischen Nervenzellen eine Funktion als Transmittersubstanz hat. Diese Ansicht wird auch durch Barker, Crayton u. Nicoll (1971) unterstützt, die cholinerge und adrenerge Agonisten sowie Antagonisten mikroelektrophoretisch in den Nucleus supraopticus der Katze applizierten; mit Acetylcholin erreichten sie einmal eine Verminderung und zum anderen eine Steigerung der antidrom abgeleiteten elektrischen Aktivität der supraoptischen Neurone. Die Verminderung konnte durch Gabe von Atropin rückgängig gemacht werden, die Steigerung durch Gabe von Dihydro-beta-erythroidin. Applizierten sie dagegen Noradrenalin, so konnte überhaupt keine elektrische Aktivität abgeleitet werden. Barker et al. schloßen daraus, daß Noradrenalin und Acetylcholin als synaptische Transmitter anzusehen sind, die auf die supraoptische neurosekretorische Aktivität einwirken und nimmt an, daß Noradrenalin einen inhibitorischen und Acetylcholin sowohl einen inhibitorischen als auch exzitatorischen Effekt an den Synapsen der neurosekretorischen Zellen hat.

Zu gleichen Ergebnissen kamen Moss, Urban u. Cross (1972), die ebenfalls mittels Mikroelektrophorese cholinerge und adrenerge Substanzen in ihrer Wirkung auf den Nucleus paraventricularis untersuchten. Auch sie fanden eine synaptische Regulation der Zellaktivität im Nucleus paraventricularis im Sinne der Inhibition durch Noradrenalin und im Sinne der Exzitation und Inhibition durch Acetylcholin.

Aufgrund der Arbeiten dieser beiden Autoren bleibt deshalb die Forderung nach einem cholinergen Mechanismus an der neurosekretorischen Zelle bestehen. Dagegen muß eine Funktion von

Acetylcholin an den neurosekretorischen Nervenendigungen für unwahrscheinlich gehalten werden. Denn frühere Versuche konnten keine exzitatorischen Nikotinrezeptoren nachweisen und durch die hier vorliegenden Versuche konnten auch keine Muskarinrezeptoren gefunden werden, die entweder inhibitorische oder exzitatorische Wirkungen vermitteln.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob an der Neurohypophyse ein muskarinartiger inhibitorischer Mechanismus der Freisetzung von Neurosekret vorhanden ist wie er an peripheren adrenergen Nerven für die Noradrenalinfreisetzung besteht.

Pro Versuchsansatz wurden zwei Rattenneurohypophysen *in vitro* in 1 ml Locke-Lösung 40 min bei 37°C inkubiert und mit Carbogen begast. Anschließend wurden die Neurohypophysen 30 min in einer Locke-Lösung mit erhöhtem Kaliumgehalt (60 mM/l) inkubiert. Der Vasopressingehalt der nach jeweils 10 min abgesaugten Inkubate wurde am Blutdruck der despalisierten Ratte bestimmt. Nach 20 - 30 min Inkubation in Locke-Lösung wurde eine konstante Vasopressinfreisetzung gemessen, die als Ruhefreisetzung angesehen wurde. Während der 30-minütigen Inkubation in Locke-Lösung mit erhöhtem Kaliumgehalt trat eine zehnfach größere Vasopressinfreisetzung auf. Fehlte CaCl_2 in den Inkubationslösungen, so war keine den Ruhewert übersteigende Vasopressinfreisetzung zu messen.

Wurden die Neurohypophysen mit 1×10^{-4} M Oxotremorin inkubiert, einer stark muskarinartig wirkenden Substanz, so wurde die Ruhefreisetzung und die durch Kalium induzierte Freisetzung nicht verändert. Ebenso wenig gelang es, durch Steigerung der Oxotremorinkonzentration (3×10^{-4} M) eine Vermehrung oder Hemmung der Vasopressinfreisetzung zu erreichen.

Daraus kann geschlossen werden, daß an den neurosekretorischen Nervenendigungen in der Neurohypophyse der Ratte Muskarinrezeptoren, die entweder eine Hemmung oder eine Steigerung der Vasopressinfreisetzung vermitteln, fehlen. Trotz verschiedener Analogien zwischen den neurosekretorischen und den adrenergen Nervenfasern bezüglich der elektrosekretorischen Koppelung, unterliegt die Vasopressinfreisetzung somit nicht dem muskarinartigen inhibitorischen Mechanismus, der an adrenergen Nervenfasern die Transmitterfreisetzung beeinflußt.

F. Literaturverzeichnis

- Bargmann, W.,
Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse.
Z. Zellforsch. 34, 610-634, 1949
- Barker, J.L., J.W. Crayton and R.A. Nicoll,
Supraoptic neurosecretory cells: adrenergic and cholinergic sensitivity.
Sciences 171, 208-210, 1971
- Brooks, C.M.C., K. Koizumi and G.A. Zeballos,
A study of factors controlling activity of neurons within the ~~para~~ ventricular, supraoptic and ventromedian nuclei of the hypothalamus.
Acta Physiol. Latinoam. 16, 83-96, 1966
- Burn, J.H. and M.J. Rand,
A new interpretation of the adrenergic nerve fibre.
Adv. Pharmacol. 1, 1-30, 1962
- Campbell, R.C.,
Statistische Methoden für Biologie und Medizin (Übersetzt von Ihm, P.).
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1971
- Cho, A.K., W.L. Haslett and D.J. Jenden,
The peripheral action of oxotremorine, a metabolite of tremorine.
J. Pharm. exp. Therap. 138, 249-257, 1962
- Daniel, A.R. and K. Lederis,
Effects of acetylcholine on the release of neurohypophysial hormones in vitro.
J. Endocrin. 34, 10-11, 1966
- Dicker, S.E.,
Release of vasopressin and oxytocin from isolated pituitary glands of adult and new-born rats.
J. Physiol.: (Lond.) 185, 429-444, 1966

Douglas, W.W.,

A possible mechanism of neurosecretion, release of vasopressin by depolarisation and its dependence on calcium.

Nature, Lond. 197, 81-82, 1963

Douglas, W.W. and A.M. Poisner,

On the mode of acetylcholine in evoking adrenal medullary secretion: Increased uptake of Ca during the secretory response.

J. Physiol.: (Lond.) 162, 385-392, 1962

Douglas, W.W. and A.M. Poisner,

Release of vasopressin from the rat's neurohypophysis in vitro.

J. Physiol.: (Lond.) 167, 55-56 P, 1963 a

Douglas, W.W. and A.M. Poisner,

On the intimate mechanism of vasopressin secretion: stimulus-secretion-coupling in the isolated neurohypophysis.

Biochem. Pharmacol. 12, 255 (Abstract No. 797), 1963 b

Douglas, W.W. and A.M. Poisner,

Stimulus secretion coupling in a neurosecretory organ: The role of calcium in the release of vasopressin from the neurohypophysis.

J. Physiol.: (Lond.) 172, 1-18, 1964 a

Douglas, W.W. and A.M. Poisner,

Calcium movement in the neurohypophysis of the rat and its relation to the release of vasopressin.

J. Physiol.: (Lond.) 172, 19-30, 1964 b

Douglas, W.W. and R.P. Rubin,

The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine.

J. Physiol.: (Lond.) 159, 40-57, 1961

Dreifuss, J.J., J.D. Grau and J.J. Nordmann,

Effects on the isolated neurohypophysis of agents which affect the membrane permeability to calcium.

J. Physiol.: (Lond.) 231, 96P-98P, 1973

Dubey, M.P. and E. Muscholl,

Muscarinic inhibition of noradrenalin release evoked by potassium ions.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. Supplement to Vol. 277, R 12, 1973

Dyball, R.E.J.,

Oxytocin and ADH secretion in relation to electrical activity in antidromically identified supraoptic and paraventricular units.

J. Physiol.: (Lond.) 214, 245-256, 1971

Dyball, R.E.J. and K. Koizumi,

Electrical activity in the supraoptic and paraventricular nuclei associated with neurohypophysial hormone release.

J. Physiol.: (Lond.) 201, 711-722, 1969

Eggena, P. and N.A. Thorn,

Vasopressin release from the rat supra-optico-neurohypophysial system in vitro in response to hyperonicity and acetylcholine.

Acta Endocrinol. 65, 442-452, 1970

Fozard, J.R. and E. Muscholl,

Effects of several muscarinic agonists on cardiac performance and release of noradrenaline from sympathetic nerves of the perfused rabbit heart.

Brit. J. Pharmacol. 45, 616-629, 1972

Gerschenfeld, H.M., J.M. Tramezzani and E. De Robertis,

Ultrastructure and function in neurohypophysis of the toad.

Endocrinology 66, 741-762, 1960

Ginsburg, M.,

Production, release, transportation and elimination of the neurohypophysial hormones. Neurohypophysial hormones and similar polypeptides. Handbook of Experimental Pharmacology,

Ed. B. Berde, 23, 286-371, Berlin, Springer, 1968

- Haeusler, G., H. Thoenen, W. Haefely and A. Hürlimann,
Electrical events in cardiac adrenergic nerves and
noradrenaline release from the heart induced by acetylcholine
and KCl.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 261, 389-411, 1968
- Haller, E.W., H. Sachs, N. Sperelakis and L. Share,
Release of vasopressin from the isolated guinea pig posterior
pituitaries.
Am. J. Physiol. 209, 79-83, 1965
- Koelle, G.B.,
A proposed dual neurohumeral role of acetylcholine: Its function
at the pre- and postsynaptic sites. Nature, Lond., 190, 208-211,
1961
- Koelle, G.B. and C. Geesey,
Localisation of acetylcholinesterase in the neurohypophysis and
its functional implications.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 100, 625-628, 1961
- Kraicer, J. and J.V. Milligan,
Effects of various secretagogues upon ^{42}K and ^{22}Na uptake
during in vitro hormone release from the rat adenohypophysis.
J. Physiol.: (Lond.) 232, 221-237, 1973
- La Bella, F.S.,
Storage and secretion of neurohypophysial hormones.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 46, 335-343, 1968
- Lederis, K. and K. Jayasena,
Storage of neurohypophysial hormones and the mechanism for their
release. Pharmacology of the Endocrine System and related Drugs:
The Neurohypophysis. International Encyclopedia of Pharmacology
and Therapeutics.
Ed. G. Peters, I, 111-143, Pergamon Press 1970
- Lederis, K. and A. Livingston,
Acetylcholine content in the rabbit's neurohypophysis.
J. Physiol.: (Lond.) 107, 37-38 P, 1966

Lindmar, R., K. Löffelholz and E. Muscholl,
A muscarinic mechanism inhibiting the release of noradrenaline
from peripheral adrenergic nerve fibres by nicotinic agents.
Brit. J. Pharmacol. 32, 280-294, 1968

Löffelholz, K.,
Untersuchungen über die Noradrenalinfreisetzung durch Acetylcholin
am perfundierten Kaninchenherzen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 258, 108-122, 1967

Löffelholz, K., R. Lindmar und E. Muscholl,
Der Einfluß von Atropin auf die Noradrenalinfreisetzung durch
Acetylcholin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 257, 308, 1967

Löffelholz, K. und E. Muscholl,
Die Hemmung der Noradrenalin-Abgabe durch Acetylcholin am
sympathisch gereizten, isolierten Kaninchenherzen. Naunyn-
Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 263, 236-237, 1969 a

Löffelholz, K. and E. Muscholl,
A muscarinic inhibition of the noradrenaline release evoked by
postganglionic sympathetic nerve stimulation.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 265, 1-15, 1969 b

MacLeod and E.A. Fontham,
Influence of ionic environment on the in vitro synthesis and
release of pituitary hormone.
Endocrinology 86, 863-969, 1970

Matthews, E.K., J.J. Legros, J.P. Grau, J.J. Nordmann and
J.J. Dreifuss,
Release of neurohypophyseal hormones by exocytosis.
Nature, New Biology 241, 86-88, 1973

Mikiten, T.M. and W.W. Douglas,
Effect of calcium and other ions on vasopressin release from
rat neurohypophysis stimulated electrically in vitro.
Nature, Lond. 207, 302, 1965

Moss, R.L., I. Urban and B.A. Cross,
Microelectrophoresis of cholinergic and aminergic drugs on para-
ventricular neurones.
Am. J. Physiol. 223, 310-318, 1972

Muscholl, E.,
Cholinomimetic drugs and release of the adrenergic transmitter;
in Schümann and Kroneberg: New Aspects of Storage and Release
Mechanisms of Catecholamines, pp. 168-186, Springer, Berlin 1970

Muscholl, E.,
Muscarinic inhibition of the norepinephrine release from
peripheral sympathetic fibres.
Pharmacology and the Future of Man. Proc. 5 th Congr. Pharmacology,
San Francisco 1972, vol. 4, pp. 440-457.

Muscholl, E. and M. Vogt,
The concentrations of adrenaline in the plasma of rabbits
treated with reserpine.
Brit. J. Pharmacol. 12, 532-535, 1957

Nagasawa, J., W.W. Douglas and R. Schulz,
Ultrastructural evidence of secretion by exocytosis and of
"synaptic vesicle" formation in posterior pituitary gland.
Nature, Lond. 227, 407, 1970

Richardson, J.A. and L.F. Woods,
Release of norepinephrine from the isolated heart.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 100, 149-151, 1959

Sachs, H.,
Neurosecretion. Control mechanism in the nervous system;
Handbook of Neurochemistry, Ed. Abel Lajatha, IV, 373-423,
Plenum Press New York-London 1970

Shipley, R.E. and J.E. Tilden,
A pithed rat preparation suitable for assaying pressor
substances.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 64, 453-455, 1947

Steinsland, O.S., R.F. Furchgott and S.M. Kirpekar,
Inhibition of adrenergic neurotransmission by parasympathomimetics
in the rabbit ear artery.
J. Pharmacol. exp. Ther. 184, 346-356, 1973

Vanhoutte, P.M., R.R. Lorenz and G.M. Tyce,
Inhibition of norepinephrine-3H release from sympathetic nerve
endings in veins by acetylcholine.

J. Pharmacol. exp. Ther. 185, 386-394, 1973

Takeshige, C and R.L. Volle,

A comparison of the ganglion potentials and block produced by
acetylcholine and tetramethylammonium.

Brit. J. Pharmacol. exp. Ther. 23, 80-89, 1964

Thorn, N.A.,

In vitro studies of the release of the mechanism for vasopressin
in rats.

Acta Endocrinol. 53, 644-654, 1966

Thorn, N.A.,

Studien über Freisetzungs- und Wirkungsmechanismus von
Vasopressin.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 257, 83, 1967

Lebenslauf

Am 21. September 1946 wurde ich, Ingrid Lohnes, geb. Langpaap, als fünfte Tochter des Oberregierungsrates i.R. Dr. Wilhelm Langpaap und seiner Ehefrau Else, geb. Schörnig, in Oppenheim am Rhein geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Oppenheim wechselte ich 1956 in das Staatliche Neusprachliche Gymnasium zu Oppenheim über und legte dort am 1. März 1966 die Reifeprüfung ab.

Von Beginn des Sommersemesters 1966 an studierte ich an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz Medizin und bestand im April 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im März 1969 die ärztliche Vorprüfung und im Juni 1972 das medizinische Staatsexamen.

Am 1. September 1972 begann ich das Medizialassistentenjahr an der II. Medizinischen Klinik der Uniklinik Mainz und wechselte am 1. Januar 1973 an die chirurgische Klinik der Uniklinik Mainz über. Seit dem 1. Mai 1973 bin ich als Medizinalassistentin im Pharmakologischen Institut der Universität Mainz beschäftigt, wo die vorliegende Dissertation entstand.

Am 31. August 1973 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Am 2. August 1968 heiratete ich den freischaffenden Konzertgitarristen Manolo Lohnes und am 12. Juni 1970 wurde unser Sohn Manuel-Aljoscha in Mainz geboren.

